

P27726

10/532580
JC12 Received PCT/PTC 25 APR 2005

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant : KIM, Jin-Hoi

Mail Stop PCT

Appl. No: : Not Yet Assigned

PCT Branch

I. A. Filed : 04 November 2003
(U.S. National Phase of PCT/KR2003/002339)

For : PORCINE UROPLAKIN II PROMOTER AND THE PRODUCTION
METHOD OF USEFUL PROTEINS USING SAID PROMOTER


CLAIM OF PRIORITY

Commissioner for Patents
U.S. Patent and Trademark Office
Customer Service Window, Mail Stop PCT
Randolph Building
401 Dulany Street
Alexandria, VA 22314

Sir:

Applicant hereby claims the right of priority granted pursuant to 35 U.S.C. 119 and 365 based upon Korean Application Nos. 10-2002-0067856, filed 04 November 2002 and 10-2003-0077256, filed 03 November 2003. The International Bureau already should have sent certified copies of the Korean applications to the United States designated office. If the certified copies have not arrived, please contact the undersigned.

Respectfully submitted,
KIM, Jin-Hoi


Bruce H. Bernstein
Reg. No. 29,027

Arnold Turk
Reg. No. 33,094

April 21, 2005
GREENBLUM & BERNSTEIN, P.L.C.
1950 Roland Clarke Place
Reston, VA 20191
(703) 716-1191

Rec'd PCT/PTO 325 APR 2005

REC'D 25 NOV 2003

WIPO PCT

KR 04.11.2003

PCT/KR03/2339



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

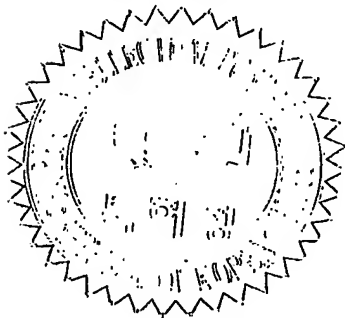
This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : 10-2002-0067856
Application Number

출원 년 월 일 : 2002년 11월 04일
Date of Application NOV 04, 2002

출원인 : 조아제약주식회사 외 1명
Applicant(s) CHO-A PHARM CO., LTD., et al.

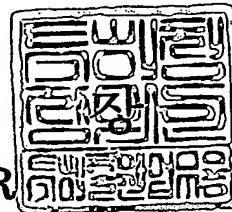
PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



2003 년 11 월 04 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】 특허출원서
【권리구분】 특허
【수신처】 특허청장
【제출일자】 2002.11.04
【발명의 명칭】 돼지의 유로플라킨 II 유전자의 프로모터 및 이를 이용한 유용 단백질의 생산 방법
【발명의 영문명칭】 Porcine uroplakin II promoter and the production method of useful proteins using said promoter
【출원인】
 【명칭】 조아제약주식회사
 【출원인코드】 1-1998-100521-4
【출원인】
 【성명】 김진회
 【출원인코드】 4-2002-032316-9
【대리인】
 【성명】 박승문
 【대리인코드】 9-1999-000536-0
 【포괄위임등록번호】 2002-076438-0
 【포괄위임등록번호】 2002-066979-5
【대리인】
 【성명】 조용식
 【대리인코드】 9-1999-000634-5
 【포괄위임등록번호】 2002-076439-7
 【포괄위임등록번호】 2002-066980-8
【대리인】
 【성명】 안소영
 【대리인코드】 9-2000-000155-5
 【포괄위임등록번호】 2002-076440-0
 【포괄위임등록번호】 2002-066981-5
【발명자】
 【성명】 김진회
 【출원인코드】 4-2002-032316-9
【심사청구】 청구

【미생물기탁】**【기탁기관명】** 생명공학연구원 유전자은행**【수탁번호】** KCTC 10352BP**【수탁일자】** 2002. 10. 17**【핵산염기 및 아미노산 서열목록】****【서열개수】** 4**【서열목록의 전자파일】** 첨부**【취지】**

특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인

박승문 (인) 대리인

조용식 (인) 대리인

안소영 (인)

【수수료】**【기본출원료】** 20 면 29,000 원**【가산출원료】** 20 면 20,000 원**【우선권주장료】** 0 건 0 원**【심사청구료】** 10 항 429,000 원**【합계】** 478,000 원**【첨부서류】**

1. 요약서·명세서(도면)_1통 2. 미생물기탁증명서[미생물기탁증명서 및 번역문]_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 돼지의 유로플라킨 II 유전자의 프로모터, 이를 포함하는 발현 벡터 및 상기 벡터를 이용한 유용단백질의 생산 방법에 관한 것이다.

본 발명의 프로모터는 높은 효율로 목적단백질의 방광 특이적 발현을 촉진한다.

본 발명의 프로모터를 이용하여 목적단백질을 발현하도록 형질전환된 동물은 소변 중에 목적단백질을 고농도로 분비하며, 이렇게 하여 생산된 단백질은 기존의 동종 단백질이 나타내는 것 이상의 우수한 생리활성을 나타낸다.

따라서 본 발명의 프로모터, 이를 이용한 발현 벡터 및 형질전환동물은 의약학적으로 중요한 가치를 지닌 유용단백질의 생산 분야에 유용하게 사용될 수 있다.

【대표도】

도 1

【명세서】

【발명의 명칭】

돼지의 유로플라킨 II 유전자의 프로모터 및 이를 이용한 유용단백질의 생산 방법 {Porcine uroplakin II promoter and the production method of useful proteins using said promoter}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 본 발명의 돼지 유로플라킨 II 프로모터를 분리하는데 사용된 프로브와, 상기 프로브에 의해 분리된 클론들의 구조를 나타낸 도이다.

도 2는 본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEPO의 구조를 나타낸 도이다.

도 3은 돼지 유로플라킨 II mRNA의 방광 특이적 발현을 나타낸 도이다.

도 4는 돼지 유로플라킨 II 단백질의 방광상피 특이적 발현을 나타낸 도이다.

도 5는 돼지 유로플라킨 II 단백질의 방광세포 중 발현을 및 우산세포 특이적 발현을 나타낸 도이다.

도 6은 본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEPO로 형질전환된 생쥐에서 EPO mRNA의 방광 특이적 발현을 나타낸 도이다.

도 7은 본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEPO로 형질전환된 생쥐에서 EPO 단백질의 발현을 나타낸 도이다.

【발명의 상세한 설명】**【발명의 목적】****【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】**

- <8> 본 발명은 돼지의 유로플라킨 II(uroplakin II) 유전자의 프로모터(promoter) 및 이를 이용한 유용단백질의 생산 방법에 관한 것이다.
- <9> 의약 분야에서 경제적 부가가치가 높은 EPO 등의 생산을 극대화하는 방법으로서, 세포배양법에 의한 대량생산방법이 주로 사용되어 왔다. 그러나, 이 방법은 동물의 혈액을 배양 배지로 이용하기 때문에 생산 비용이 높아지고, 배양기술에 있어서 전문적인 지식이 요구된다. 또한 배지성분에 함유된 동물의 EPO와 새로 생산한 EPO를 완전히 분리하는 것이 불가능하기 때문에 최종적으로 얻는 EPO의 순도가 낮고, 활성이 낮다는 문제점이 있다.
- <10> 반면 형질전환동물을 이용한 유용단백질 생산 방법은, 동물이 분비하는 체액 중에 목적단백질이 포함되므로 기존의 세포배양법에 비해 목적단백질의 분리·정제가 용이하며, 활성 또한 우수하게 유지되므로 이 분야에 대한 관심이 급증하고 있다.
- <11> 현재까지의 형질전환동물 생산기술에서 목적단백질을 생산하는 조직은 주로 단백질 발현율이 높은 것으로 알려진 유선 조직이었다. 그러나 동물실험 결과, EPO와 같은 몇몇 중요한 단백질의 경우, 우유(milk)에서의 발현은 유선조직 이외의 타조직에서의 발현 때문에 궁극적으로 목적단백질을 생산하는 것이 불가능한 것으로 나타났다. 또한 우유에는 원래 알부민 등 여러 종류의 단백질이 다량 포함되어 있으므로, 결과적인 목적 단백질 수율은 낮아진다.
- <12> 이러한 문제점을 극복하기 위하여, 방광을 이용한 유용단백질 생산방법이 최근 시도되고 있다.

<13> 방광은 동물의 연령이나 성에 상관없이 일생에 걸쳐 소변을 생산하며, 소변 중에는 단백질 및 지방 성분이 5~25mg/ℓ 수준의 극소량만 포함되어 있어 목적단백질의 분리 및 정제가 훨씬 용이하다.

<14> 그러나 지금까지 개발된 방광특이적 프로모터를 이용하여 형질전환된 동물의 단백질 생산 효율은 실제로 매우 낮은 수준에 머무르고 있다.

<15> 따라서, 목적단백질 발현을 높은 효율로 촉진하는 방광 특이적 프로모터의 개발이 시급하다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<16> 본 발명에서는 돼지의 방광에서 특이적으로 목적단백질의 발현을 촉진하는 유로플라킨 II 유전자의 프로모터를 분리하고, 이를 이용하여 유용단백질을 대량 생산할 수 있는 방법을 제공하고자 한다.

【발명의 구성 및 작용】

<17> 본 발명은 돼지의 유로플라킨 II 유전자의 프로모터를 제공한다.

<18> 본 발명의 돼지 유로플라킨 II 프로모터는 구체적으로 서열번호 1의 염기서열, 또는 상기 서열에 하나 이상의 붕괴(disruption), 결실(deletion), 삽입(insertion), 점(point), 치환(substitution), 논센스(nonsense), 미스센스(misense), 다형현상(polymorphism), 재배열 돌연변이(mutation)가 일어난 기능적 등가물 중 선택된 하나가 될 수 있다.

<19> 또한 본 발명은 상기 프로모터의 전체 또는 일부를 포함하는 것을 특징으로 하는 발현벡터를 제공한다.

- <20> 본 발명의 발현 벡터는 구체적으로 상기 프로모터를 포함하며, 그 3' 쪽으로 목적단백질을 암호화하는 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- <21> 또한 본 발명은 상기 발현 벡터를 동물의 수정란에 도입하고, 상기 수정란을 이용하여 형질전환시킨 동물을 제공한다.
- <22> 또한 본 발명은 형질전환동물로부터 소변을 수거하여, 발현된 목적단백질을 분리·정제하는 방법으로 이루어진 유용단백질의 대량생산방법을 함께 제공한다.
- <23> 본 발명의 프로모터는 돼지의 유로플라킨 II 구조유전자의 5' 쪽에 위치하여 유로플라킨 II 구조유전자의 발현을 조절한다.
- <24> 본 발명의 프로모터는 돼지의 게놈 라이브러리(genome library)를 스크리닝(screening)하여 분리할 수 있으며, 그 분리 방법은 다음과 같다.
- <25> 우선 스크리닝의 프로브로 사용될 돼지 유로플라킨 II 유전자의 염기서열 일부를 얻기 위해, 염기서열이 공지된 다른 동물들의 유로플라킨 II 염기서열을 비교하여 종 간에 잘 보존된 부분을 바탕으로 프라이머를 제작하고(정방향 프라이머: 서열번호 2, 역방향 프라이머: 서열번호 3), 돼지 방광의 전체 RNA(total RNA)를 주형으로 하여 RT-PCR을 수행한다.
- <26> RT-PCR을 통해 유로플라킨 II 염기서열의 일부를 얻은 후, 이를 프로브로 하여 돼지의 게놈 라이브러리를 스크리닝한다. 본 발명에서 사용한 프로브는 도 2에 나타난 바와 같이, 유로플라킨 II 구조유전자의 2번 엑손부터 5번 엑손에 걸치는 부분을 포함하는 프로브 A, 그리고 1번 엑손부터 2번 엑손에 걸치는 부분을 포함하는 프로브 B의 두 종류이다.

- <27> 라이브러리 스크리닝 결과, 도 2에 나타난 바와 같이 유로플라킨 II 구조유전자 또는 프로모터 부분을 포함하는 클론들을 얻고, 이들의 염기서열을 비교하여 프로모터의 염기서열을 최종적으로 결정하여, 돼지 유로플라킨 II 프로모터의 완전한 염기서열을 얻는다.
- <28> 이렇게 하여 얻은 프로모터는 총 8847bp의 크기를 가지며, 그 염기서열에 있어서 세포에서 항상 일정하게 발현되는 유전자(housekeeping gene)의 특징인 높은 G/C 함량율을 나타내며, AP2 및 GATA 박스 등의 다양한 Sp1 엘레먼트(element)를 포함한다.
- <29> 본 발명의 프로모터는 돼지의 여러 신체 조직 중 방광조직에서만 특이적으로 단백질을 발현시킨다. 돼지 유로플라킨 II의 경우, 전체 방광세포의 8~14% 정도에서 발현되며, 특히 방광상피 상부기저세포(urothelial suprabasal cell) 중 활발하게 증식하며 세포분열 중인 우산세포(umbrella cell)에서 높은 발현율을 나타낸다.
- <30> 이처럼 본 발명의 프로모터는 높은 효율로 단백질의 방광 특이적 발현을 유도하므로, 본 발명의 프로모터를 이용하면 방광특이적으로 외부에서 유래한 목적단백질을 발현하는 발현 벡터를 제조할 수 있다.
- <31> 본 발명의 발현 벡터를 제조할 때는, 단백질 발현에 사용되는 기존의 벡터를 기본 골격으로 하여, 본 발명의 프로모터를 삽입하고, 그 3' 쪽으로 목적단백질을 암호화하는 염기서열을 삽입함으로써 제조한다.
- <32> 본 발명의 발현 벡터에서, 기본 골격으로 사용되는 벡터는 일반적으로 사용되는 발현 벡터 중 적절한 하나를 선택하여 사용할 수 있으며, 그 예로 다양한 클로닝 부위를 가진 pBluescript SK 계열의 벡터를 비롯하여, pLNCX 등의 리트로바이러스 벡터(retroviral vector) 등을 들 수 있다.

- <33> 본 발명의 발현 벡터는, 의약품의 유효성분으로서 사용되는 모든 단백질, 즉 EPO(erythropoietin), 알도스테론(aldosterone), 아드레노코티코트로핀(adreno-corticotropin), 혈액응고인자(blood clotting factor), 고나도트로핀(gonado-tropin), 인슐린(insulin), 프로락틴(prolactin) 또는 바소프레신(vasopressin) 등을 발현시킬 수 있다.
- <34> 또한 본 발명의 발현 벡터는 필요에 따라 또다른 프로모터, 인핸서(enhancer), 5'-UTR(untranslated region), 3'-UTR, 폴리아데닐화 신호(polyadenylation signal), 리보솜 결합 서열, 게놈의 특정 부위로 삽입될 수 있는 염기서열, 표지 유전자, 또는 인트론을 적절한 위치에 포함할 수 있다.
- <35> 본 발명은 상기 발현 벡터의 바람직한 예로, 돼지 유로플라킨 II 프로모터의 조절 하에 인간 EPO를 발현할 수 있는 발현 벡터 pUP2/hEPO를 제공한다(도 3).
- <36> 본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEPO는 pBluescript SK(-) 벡터를 기본 골격으로 사용하며, 본 발명의 유로플라킨 II 프로모터의 3' 쪽에 인간 EPO를 암호화하는 유전자(Lin F. K. et al, Proc. Natl. Acad. Sci, USA, Cloning and expression of the human erythropoietin gene, 82:7580-7584, 1985, 서열번호 4)가 융합되어 있다. 본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEPO는 2002년 10월 17일 한국 생명공학연구원 유전자은행에 기탁번호 KCTC 10352BP로 기탁하였다.
- <37> 본 발명의 발현 벡터로 형질전환될 수 있는 동물은 소변을 분비하는 모든 동물, 즉 돼지, 생쥐, 소, 닭, 양 또는 염소 등이다.
- <38> 본 발명의 발현 벡터를 이용한 형질전환동물의 생산 방법은 통상적인 방법에 의한다. 형질전환하고자 하는 동물 중 건강한 개체로부터 수정란을 채취하고, 수정란에 본 발명의 발현

백터를 도입한 후, 정관결찰 생쥐를 이용하여 위임신 생쥐를 얻고, 이를 대리모로 하여 난관 내에 수정란을 이식한 후, 대리모로부터 얻은 자손 중 형질전환된 개체를 선별하는 과정으로 이루어진다.

<39> 이후 형질전환된 것으로 확인된 개체로부터 소변을 수거한 후, 목적단백질을 분리·정제함으로써 유용단백질을 생산하게 된다.

<40> 본 발명의 유용단백질 생산방법에서, 분리·정제 방법은 통상적으로 사용되는 방법을 사용할 수 있으며, 구체적으로는 여과법 또는 크로마토그래피법 등이 될 수 있다.

<41> 이렇게 하여 제조되는 본 발명의 형질전환동물은 방광 특이적으로 목적단백질을 발현하며, 기존의 방법에 비해 매우 높은 농도로 소변 중에 목적단백질을 발현한다.

<42> 그 예로, 본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEPO로 형질전환된 생쥐의 경우, 0.5~1mg/ml 수준의 높은 EPO 발현율을 나타낸다. 원래 EPO는 태아의 조기 사망을 유발하기 때문에 발현시키기 어려운 단백질임에도 불구하고, 기존의 유로플라킨 프로모터를 이용한 소변 중 단백질 발현율에 비해 1000배 이상의 높은 발현율을 나타낸다.

<43> 또한 본 발명의 형질전환동물로부터 생산된 단백질은 시판되는 동종 단백질이 나타내는 것 이상의 우수한 생리활성을 나타낸다.

<44> 그 예로, 본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEPO로 형질전환된 생쥐로부터 얻은 EPO는, EPO의 존성 세포인 간세포주(hepatocyte cell line)의 생존율을 시판되는 EPO보다 높은 수준으로 유지시킨다.

<45> 따라서 본 발명의 프로모터, 이를 이용한 발현 벡터 및 형질전환동물은 그간 대량생산하기가 어려웠던 유용단백질의 생산 분야에 유용하게 사용될 수 있다.

<46> 이하 본 발명을 하기 실시예에서 보다 상세하게 설명하되, 실시예에 의해 본 발명의 범위가 국한되는 것은 아니다.

<47> [실시예 1] 본 발명의 돼지 유로플라킨 II 프로모터의 분리

<48> 본 발명의 돼지 유로플라킨 II 프로모터를 분리하기 위해, 다음과 같이 실험을 수행하였다.

<49> 1) RT-PCR(Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction)에 의한 프로브 준비

<50> 돼지의 유로플라킨 II 유전자의 염기서열이 공지되지 않았기 때문에, 염기서열이 공지된 생쥐와 소의 유로플라킨 II cDNA를 비교하여 두 종 간에 높은 상동성을 나타내면서 보존된 부분을 참조하여, 돼지 유로플라킨 II cDNA의 증폭에 사용될 디제너레이트 프라이머(degenerate primer)를 제조하였다. 정방향 프라이머의 염기서열은 서열번호 2, 역방향 프라이머의 염기서열은 서열번호 3에 각각 나타나 있다.

<51> 상기 프라이머를 이용하여, 돼지 방광의 전체 RNA(total RNA)에 대해 MuMLV 역전사효소를 사용하여 RT 반응을 수행하고, 그 결과 얻은 cDNA에 대해 Taq 중합효소를 사용하여 PCR을 수행하였다. 증폭된 DNA는 염기서열 판독 결과, 유로플라킨 II의 구조유전자 일부인 것으로 확인되었으며, pGEM T- easy 벡터를 사용하여 클로닝하였다.

<52> 유로플라킨 II 프로모터를 분리하는데 사용될 프로브를 제조하기 위해, 상기에서 클로닝한 DNA 50ng을 3분간 끓인 후, 얼음에서 식혀 변성(denature)시켰다. 변성된 DNA를 프라이머, dNTP, [α - 32 P]dCTP(3000 Ci/nmol, NEN)를 함유하는 반응 완충액에 첨가한 후, 클레노우 효소

(Klenow fragment)를 첨가하여 37℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 이렇게 하여 제조된 프로브는 유로플라킨 II 구조유전자의 2번 엑손부터 5번 엑손에 걸치는 부분을 포함하는 프로브 A, 그리고 1번 엑손부터 2번 엑손에 걸치는 부분을 포함하는 프로브 B의 두 종류이다(도 1).

<53> 이후 반응액을 세파덱스 컬럼(Sephadex G-50 column)을 사용하여 정제함으로써, ³²P로 표지된 돼지 유로플라킨 II 프로모터 탐지용 DNA 프로브 A 및 프로브 B를 준비하였다.

<54> 2) 라이브러리 스크리닝(Library Screening)

<55> 돼지 유로플라킨 II 프로모터를 분리하기 위해, 돼지의 게놈 라이브러리를 스크리닝하였다. 본 실시예에서 돼지의 게놈 라이브러리는 람다 픽스 II 파지 벡터(lambda FixII phage vector, Stratagene)에 삽입된 것을 사용하였다.

<56> 라이브러리를 도입할 호스트 박테리아는 다음과 같이 준비하였다.

<57> 0.2%의 말토오스(maltose)가 함유된 LB 배지 5ml에 박테리아 콜로니 하나를 접종하여 37℃에서 하룻밤 동안 배양하였다. 상기 배양액의 1%를 다시 새로운 0.2%의 말토오스 함유 LB 배지 50ml로 옮겨, 2.5시간 동안 배양하였다. 600nm에서의 흡광도가 0.5 정도 되었을 때, 배양액을 2500rpm의 속도로 10분간 원심분리하였다. 그 결과 얻은 세포 침전물을 멸균한 10ml 황산 마그네슘 용액에 현탁시켜, 최종농도가 1×10^{10} 세포/ml이 되도록 하고, 실험할 때까지 4℃에 보관하였다.

<58> 라이브러리를 적정(titration)하기 위해, 라이브러리를 SM 용액에 여러 농도로 연속 희석(serial dilution)하였다. 고체 LB 배지가 담긴 플레이트(plate)를 37℃ 항온반응기(incubator)에서 데우고, 탑 아가(top agar)를 녹여 48℃로 유지되는 수조에 놓아두었다. 여러

농도로 희석된 파지 용액 $10\mu\text{l}$ 와 상기에서 준비한 호스트 박테리아 $100\mu\text{l}$ 를 혼합하여, 37°C 에서 호스트 박테리아를 감염(infection)시켰다.

<59> 탐 아가에 파지로 감염된 호스트 박테리아를 첨가하고 잘 흔들어 준 후, 상기에서 준비해 둔 LB 배지 위에 부었다. 15분 후 플레이트를 거꾸로 뒤집어 37°C 항온반응기에서 하룻밤 동안 배양하였다. 밤새 배양한 플레이트의 배지 상에서는 파지가 호스트 박테리아 내에서 라이브러리 DNA를 복제한 후 호스트 박테리아를 용해시킨 흔적인 플라그가 형성되었으며, 이후의 실험 단계를 위해 배지를 4°C 에서 1시간 이상 식혔다.

<60> 상기 플레이트에 대해, 일련 번호를 기재한 NC 필터를 준비하고, 필터의 가운데 부분부터 당도록 하여 상기에서 준비한 라이브러리 DNA 플레이트 위에 필터를 덮었다. 필터에 바늘을 수직으로 찔러 위치를 표시하고, 1분 후 조심스럽게 필터를 배지로부터 떼어냈다.

<61> 각 필터를 변성화 용액(denaturation solution), 중성화 용액(neutralization solution) 및 $2\times\text{SSC}$ 용액에 차례로 1분씩 담근 후, 80°C 오븐에서 2시간 동안 두어, 전이된 라이브러리 DNA가 필터 상에 완전히 고정(immobilization)되도록 하였다.

<62> 고정된 필터를 $2\times\text{SSC}$ 용액 상에 띄워 적신 후, 전혼성화 용액(prehybridization solution)이 들어 있는 페트리 디시(petri dish)에 하나씩 담그고, 68°C 에서 1시간 동안 살살 흔들어 주면서 전혼성화 반응을 수행하였다. 전혼성화 반응 후, 상기 실시예 1의 1)에서 준비한 프로브를 첨가하고, 68°C 에서 18시간 동안 살살 흔들어 혼성화 반응을 수행하였다. 혼성화 반응 후, 0.1% SDS를 함유하는 $2\times\text{SSC}$ 용액에 필터를 담그고, 65°C 에서 10분 동안 흔들면서 세척하는 과정을 2번 반복하였다. 세척 후, 필터를 공기 중에서 건조시키고, 자기방사기록법(autoradiography)을 수행하였다.

- <63> 자기방사기록과 플레이트를 대조하여, 양성 반응을 보이는 플라그를 선택하고, 플라그를 SM 완충액 500 μ l에 넣고 클로로포름(chloroform) 한 방울을 첨가한 후 잘 섞어 4℃에 보관한다. 상기과 같은 스크리닝 과정을 세번 반복하여, 양성반응을 나타내는 클론들을 최종적으로 얻었다. 각 클론이 함유하는 DNA는 정제 키트(Qiagen lambda mini kit)를 이용하여 정제하였다.
- <64> DNA 염기서열의 판독은 ABI 377 DNA sequencer(Applied Biosystem)을 이용하였으며, 서열판독결과는 CAP2 sequence assembly system을 사용하여 처리하고, 서열비교는 BLAST, SMART, PROSITE 등을, 그리고 모티프(motif) 분석은 Clustal W 프로그램을 사용하였다.
- <65> 그 결과 프로브 A를 사용하여 스크리닝한 경우, 도 1의 클론 A 및 클론 B를 얻었으며, 프로브 B를 사용하여 스크리닝한 경우, 도 1의 클론 C 및 클론 D를 얻었다. 이들 클론은 각각 돼지 유로플라킨 II 프로모터 또는 그 3' 방향으로 구조유전자를 포함하고 있으므로, 이들을 비교하여 돼지 유로플라킨 II 프로모터의 완전한 염기서열을 얻었다.
- <66> 본 발명의 돼지 유로플라킨 II 프로모터는 총 8847bp의 크기로, 그 염기서열은 서열번호 1에 나타나 있다.
- <67> 3) 본 발명의 프로모터의 조절 하에 발현되는 단백질의 발현 양상 확인
- <68> 본 발명의 프로모터의 조절 하에 발현되는 단백질의 발현 양상을 확인하기 위해, 돼지 유로플라킨 II의 발현을 다음과 같이 확인하였다.
- <69> 3-1) 본 발명의 프로모터의 조절 하에 발현되는 단백질의 방광 특이적 발현 확인
- <70> 본 발명의 프로모터의 조절 하에 발현되는 단백질이 방광 특이적으로 발현됨을 노던 분석(Northern analysis)을 통해 확인하였다.

- <71> 상기 실시예 1의 2)에서 얻은 돼지 유로플라킨 II cDNA를 프로브로 하였으며, 이때 대조군으로 모든 조직에서 일정하게 발현되는 액틴에 대한 프로브도 준비하였다. 상기 프로브들을 사용하여 여러 종류의 돼지 신체 조직에서 돼지 유로플라킨 II mRNA의 발현을 확인하기 위해, 방광, 심장, 간, 신장, 폐, 자궁 및 지라 등의 조직에 대한 전체 RNA에 대해 다음과 같이 을 수행하였다.
- <72> 아가로스(agarose) 0.7g을 250ml 용량의 삼각 플라스크에 넣고 증류수 58 ml을 첨가하여, 전자레인지에서 완전히 녹인 후 60℃로 유지되는 항온 수조에서 식혔다. 아가로스 젤의 온도가 60℃ 정도로 맞춰졌을 때, 10 ×이동완충용액(running buffer) 7ml을 조심스럽게 흔들면서 첨가하고, 추가로 11.9ml의 포름알데히드(formaldehyde)를 첨가하여 1 ×포름알데히드 이동 젤 용액을 준비하였다. 미리 설치된 전기영동기구에 상기 용액을 붓고 20분 정도 방치하여 젤을 제조하였다.
- <73> 미세원침관에 RNA 6 μ l, 10 ×이동완충용액 2.5 μ l, 포름알데히드 4 μ l, 포름아미드(formamide) 12.5 μ l를 잘 혼합하여, 65℃에서 5분간 가열한 후 얼음 속에서 냉각시켰다. 상기 시료에 젤 로딩 완충용액(gel-loading buffer) 2.5 μ l를 첨가하여 잘 혼합한 후, 50 V로 약 5분간 미리 전기영동시킨 젤에 로딩하여 1 ×이동완충용액에서 120 V/cm로 전기영동을 시행하였다. 전기영동 후, 0.05 N 수산화나트륨 용액에 젤을 약 10분 정도 담가두어, 이후의 전이과정에서의 효율이 증진되도록 RNA를 부분 절단하였다.
- <74> 젤을 pH 7.5의 0.1 M 트리스 용액에 30분간 담가두고, 다시 20 ×SSC 용액(3M 염화나트륨, 0.3M 염화시트레이트(sodium-citrate), pH 7.3)에 약 30분 가량 담가둔 후, 양이온으로 하전된 멤브레인을 이용하여 RNA를 전이시켰다. 전이가 끝난 멤브레인은 RNA 고정을 위해 80℃에서 2시간 동안 두었다.

- <75> 멤브레인을 비닐 백에 넣고 멤브레인이 완전히 잠길 수 있는 최소 부피의 혼성화용액을 담은 후, 68℃의 진동 항온반응기에서(shaking incubator)에 1시간 이상 보관하였다. 이후, 용액을 빼내고 프로브가 함유된 혼성화용액 15ml로 교체하여 68℃의 진동 항온반응기에서 하룻밤 동안 방치하였다.
- <76> 혼성화 후, 상온에서 세척용액 1(2 ×SSC, 0.1% SDS)을 교체해가며 30분간 멤브레인을 세척하고, 이후 55℃에서 세척용액 2(0.2 ×SSC, 0.1% SDS)을 교체해가며 30분간 멤브레인을 세척하였다. 멤브레인을 상온에서 완전히 건조시킨 후, 자기방사기록법(autoradiography)을 수행하여 돼지 유로플라킨 II mRNA의 발현 여부를 비교하고, 그 결과를 도 3에 나타내었다.
- <77> 도 3a에 나타난 바와 같이 대조군인 액틴 mRNA은 모든 조직에서 고르게 발현된 반면, 도 3b에 나타난 바와 같이 본 발명의 프로모터의 조절 하에 발현되는 유로플라킨 II mRNA는 돼지의 방광에서만 특이적으로 발현되었다(도 4b).
- <78> 따라서, 본 발명의 프로모터는 방광 특이적으로 단백질을 발현시킴을 알 수 있다.
- <79> 3-2) 본 발명의 프로모터의 조절 하에 발현되는 단백질의 방광상피 특이적 발현 확인
- <80> 한편 본 발명의 프로모터의 조절 하에 발현되는 단백질이 방광 조직 중 어느 세포에서 발현되는지를 확인하기 위해, 다음과 같이 면역조직염색을 수행하였다.
- <81> 돼지 방광 조직의 파라핀 절편을 준비하여, 히스토클리어(Histoclear) 용액에 약 10분 동안 담가 파라핀을 제거하였다. 절편을 점차적으로 농도를 감소시키면서 알콜 수용액에 담가 탈수시킨 후, 3% 과산화수소를 함유하는 메탄올 및 0.1% 펩신을 함유하는 0.05N 염산(pH 2.25) 용액에 30분 동안 담가두어, 비특이적으로 염색되는 것을 미리 방지하였다.

- <82> 상기 절편을 TBS 완충액(0.05 M 트리스, pH 7.4, 0.85% 염화나트륨)을 이용하여 5분간 두번씩 세척한 후, 1:5의 비율로 일반 말 혈청을 희석한 TBS에서 블로킹(blocking) 반응을 수행하였다.
- <83> 블로킹된 절편은 1:500의 비율로 1차 항체를 희석한 TBS에 하룻밤 동안 담가두었다. 이때 1차 항체로 돼지 유로플라킨 II 단백질에 특이적으로 결합할 수 있도록 제조된 다중클론항체(polyclonal antibody)를 사용하였으며, 음성 대조군으로 ABC 키트의 말혈청 1방울을 사용하였다.
- <84> 1차 항체 반응을 수행한 절편을 TBS로 5분씩 2번 세척하여 과량의 항체를 제거한 후, 바이오틴(biotin)이 부착된 2차 항체와 30분간 반응시켰다. 이후 절편을 TBS로 5분간 3번 세척한 후, ABC 시약과 30분간 반응시켰다. 다시 절편을 TBS로 세척하고, 1% 트리톤(Triton)-X 100을 함유하는 PBS로 30초 행구어 준 후, 0.5% DAB(diaminobenzidine) 및 0.01% 과산화수소를 함유하는 0.05M 트리스 완충액(pH 7.6)과 반응시켜 발색 반응을 수행하였다.
- <85> 발색 반응 후, 절편을 물로 세척하고 탈수시키고 마운팅한 후, 광학현미경 하에서 발색된 부분을 관찰하여 그 결과를 도 4에 나타내었다.
- <86> 도 4a의 대조군에서는 어떠한 양성반응도 나타나지 않았으나, 도 4b에서 방광조직에 유로플라킨 II 단백질에 대한 항체를 반응시킨 결과, 본 발명의 프로모터는 유로플라킨 II 단백질을 돼지 방광상피에서만, 특히 상부기저세포의 세포질에서 특이적으로 발현되도록 조절하는 것으로 나타났다.
- <87> 3-3) 본 발명의 프로모터 조절 하에 발현되는 단백질의 발현을 확인

- <88> 방광상피세포는 단백질 합성이 활발하게 일어나는 유선조직에 비해 상대적으로 단백질 합성 능력이 낮은 것으로 알려져 있으므로, 본 발명의 프로모터 조절 하에 발현되는 단백질의 실제 발현 수준을 레이저 스캐닝 세포분석(Laser scanning cytometry: 이하 'LSC'라 한다)을 통해 다음과 같이 확인하였다.
- <89> 돼지 방광조직을 잘게 찢어, 1mg/ml 콜라게나제 타입 I(collagenase type I, Sigma), 0.51 mg/ml 히알루로니다제(hyaluronidase, Sigma), 50 μ g/ml 젠타마이신(gentamicin)을 함유하는 DMEM/F12 배지(Gibco)에 첨가하고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 분해반응을 수행하였다.
- <90> PBS로 세척한 후, 60 μ m 나일론 망(Milipore)을 사용하여 큰 덩어리를 걸러내고, 현탁된 단일 세포들을 0.1% 젤라틴으로 코팅된 Lab-Tek চে임버 슬라이드(Nunc)에 부착시켰다. 슬라이드에 부착된 세포들을 차가운 PBS로 세척한 후, 차가운 메탄올로 15분간 고정시키고, 0.1% 트리톤-X 100 용액에 10분간 처리하였다.
- <91> 고정된 세포들을 1% BSA를 함유하는 PBS 용액에서 1시간 동안 블로킹시키고, 상기 실시예 1의 3-2)에서 제조한 유로플라킨 II 다중클론항체를 1:100으로 희석한 용액에서 2시간 동안 실온반응시켰다. 세포들을 PBS로 세척한 후, FITC가 부착된 항-생쥐 IgG 2차 항체(Cappel Laboratories)와 반응시켰다. 이때, 음성대조군으로서 2차 항체만 반응시킨 군도 함께 준비하였다.
- <92> 0.1% 트윈-20을 함유하는 PBS로 3번 세척한 후, 전체 세포수를 측정할 수 있도록 50 μ g/ml PI(propidium iodide)로 염색하였다. LSC 분석시 488nm의 아르곤 레이저로 형광을 방출시키고, FITC의 경우 530nm에서, PI의 경우 570nm 필터를 이용하여 각각의 형광 발현을 관찰하고 그 결과를 도 5에 나타내었다. 음성대조군에 대한 분석결과는 도 5a, 방광 세포 중 유로플라킨

II를 발현하는 세포에 대한 분석결과는 도 5b, 유로플라킨 II를 발현하는 방광세포의 면역표현형 분석은 도 5c에 각각 나타내었다.

<93> 도 5b에 나타난 바와 같이, 전체 방광세포의 8~14% 정도가 유로플라킨 II를 발현하였으며, 도 5c에서 이들은 대부분 활발히 증식하고 분열하는 중인 우산세포임을 확인하였다. 일반적으로 소변 내의 단백질이 보통 5~25mg/l의 매우 낮은 수준임을 감안할 때, 상기와 같은 수준의 유로플라킨 II 발현율은 상당히 높은 것이며, 유선 조직을 이용했을 때보다 더 높은 효율로 단백질을 분리·정제할 수 있도록 할 것으로 추정된다.

<94> 따라서, 본 발명의 프로모터는 방광 내에서 우수한 효율로 목적단백질이 발현되도록 할 수 있다.

<95> [실시에 2] 본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEPO의 제조

<96> 상기 실시예 1에서 분리한 본 발명의 프로모터를 이용하여, 상기 프로모터의 조절 하에 EPO를 발현하는 벡터를 다음과 같이 제조하였다.

<97> 기본 골격 벡터로 pBluescript SK(-) 벡터를 정하여, 상기 실시예 1의 2)에서 분리한 본 발명의 프로모터를 삽입하였다. 그후 프로모터의 3' 쪽에 인간 EPO를 암호화하는 유전자(서열 번호 4)를 삽입하였다.

<98> 그 결과 얻은 본 발명의 발현 벡터의 구조는 도 2에 나타나 있으며, 본 발명의 유로플라킨 II 프로모터의 조절 하에 EPO를 발현하게 된다. 상기 벡터를 pUP2/hEPO으로 명명하고, 2002년 10월 17일 한국 생명공학연구원 유전자은행에 기탁번호 KCTC 10352BP로 기탁하였다.

<99> [실시예 3] 본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEP0를 도입한 수정란의 제조

:100> 상기 실시예 2에서 제조한 본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEP0를 도입한 수정란을 다음과 같이 제조하였다.

:101> 1) 수정란의 채취

:102> 수정란을 채취하기 3일 전에 암컷 생쥐의 복강 내에 PMSG를 투여하고, 2일 후 오후 5시에 hCG를 투여한 후, 수컷 생쥐와 교배시켰다. 교배 다음날 오전 중에 암컷 생쥐에서 플러그(plug)가 생성되었는지를 관찰하여 임신 여부를 확인하였다.

:103> 임신한 것으로 확인된 생쥐를 경추탈골시킨 후, 외과용 가위로 개복하여 자궁의 결합조직부분을 분리하였다. 난관과 자궁 사이를 핀셋으로 찢은 후, 난소와 난관 사이를 가위로 자르고, 핀셋으로 찢은 부분의 자궁 쪽을 잘라 난관을 분리하였다.

:104> 분리한 난관을 M2 배지에 넣어 보온판 위에 올려놓고, 온도가 내려가는 것을 방지하였다. 1ml 바늘을 이용하여 현미경 하에서 난관 팽대부를 터뜨려 배아(embryo)를 회수하였다. 회수한 배아를 미리 실온에 꺼내둔 히알루로니다제 용액에 넣고, 난구세포가 떨어질 때까지 방치하였다.

:105> M2 배지로 2~3 차례 세척한 후, 13000rpm에서 5분간 원심분리하고, 다시 M2 배지로 2~3 차례 세척하여 정상란을 선별하였다. 선별된 수정란은 파라핀 오일로 도포된 M16 배지에서 2~3 차례 세척한 후, 37℃ 항온반응기로 옮겨 보관해두었다.

:106> 2) 수정란에 DNA 주입

107> 미세조작기(micromanipulator)를 이용하여, 상기 실시예 2-1)에서 채취한 수정란에 본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEPO를 주입하였다.

108> [실시예 4] 본 발명의 프로모터의 조절 하에 인간 EPO를 생산하는 형질전환 생쥐의 제조

109> 상기 실시예 3에서 제조한 수정란을 이용하여, 본 발명의 프로모터의 조절 하에 인간 EPO를 생산하는 형질전환 생쥐를 다음과 같이 제조하였다.

110> 1) 정관결찰 생쥐의 제조

111> 대리모를 위임신시키는데 사용할 정관결찰 생쥐는 다음과 같이 제조하였다.

112> 6주령의 수컷 ICR 생쥐를 선택하여 마취시킨 후, 핀셋과 가위로 치골에서부터 약 1.5cm 되는 상부의 외피를 정중선을 따라 약 1cm 가량 절개하였다. 절개구가 겹치지 않도록 오른쪽 또는 왼쪽으로 비켜서 근층을 절개하고, 음낭으로 내려와 있는 정소를 복강 내로 이동시켰다. 핀셋으로 정소, 정소상체 및 정관을 분리한 후, 정관 주변의 막을 핀셋으로 분리하여 달군 핀셋으로 정관을 끊어주었다. 정관이 분리된 것을 확인한 후, 근층을 봉합하고 마취가 깰 때까지 가온기에 두었다.

113> 2) 위임신 대리모 생쥐의 제조

- 114> 실험일 전에 발정이 확인된 ICR 암컷 생쥐를 상기 실시예 3-1)에서 제조한 정관결찰 생쥐와 교배시켰다. 실험일 오전에 암컷 생쥐에서 플러그가 생성되었는지를 관찰하여 위임신 여부를 확인하였다.
- 115> 3) 난관 내 이식
- 116> 상기 실시예 2의 2)에서 제조한 수정란을 이식용 피펫에 일렬로 배열하였다. 마취시킨 대리모 생쥐의 외피와 근층을 조금 절개하고, 홍채핀셋을 사용하여 난소, 난관 및 자궁각의 상부를 체외로 끌어내었다. 난소낭을 통해 보이는 부분이 위로 가도록 난소의 위치를 잡고, 지혈 크렌메로 지방조직을 끼워 고정시켰다.
- 117> 실체 현미경 하에서 난소낭의 막을 절개하고, 난관과 난소를 끌어당겨 난관체를 찾아, 이식용 피펫의 앞쪽 끝부분을 2~3mm 삽입하여 수정란을 배양액과 함께 난관 내로 조심스럽게 주입하였다. 피펫 내의 기포 두 개 중 마커로 하는 첫번째 기포가 난관 내에 삽입되는지 관찰하여 수정란이 확실히 주입되는 것을 확인하였다.
- 118> 상기 대리모 생쥐로부터 자손을 얻고, 그 중 형질전환된 생쥐를 확인하기 위해, EPO의 엑손 1과 엑손 2를 프로브로 사용하여 노던 분석을 수행한 결과, 76마리의 생쥐 중 12마리가 형질전환된 것으로 확인되었다.
- 119> 형질전환 생쥐에 대해, EPO 단백질의 발현 양상을 확인한 결과, 예상한 바와 같이 EPO 단백질은 방광 특이적으로 발현됨을 알 수 있었다(도 6).
- 120> [실시예 5] 본 발명의 형질전환 생쥐로부터 인간 EPO의 생산

121> 1) 본 발명의 형질전환 생쥐의 소변 중의 EPO 발현을 확인

122> 본 발명의 형질전환 생쥐의 소변 중의 EPO 발현을 확인하기 위해, 형질전환 생쥐로부터 소변을 얻어 여과한 후, HPLC 분석을 수행하였다. 각 분획의 단백질 성분을 조사하기 위해, 전기영동 및 웨스턴 분석을 수행하여 그 결과를 도 7에 나타내었다.

123> 도 7a의 전기영동결과 및 도 7b의 웨스턴 분석결과에 나타난 바와 같이, 본 발명의 형질전환 생쥐로부터 얻은 소변 중에는 EPO가 높은 농도로 존재하였다.

124> 소변 중의 EPO 농도를 수치화한 결과, 0.5~1mg/ml 수준인 것으로 나타났는데, 이러한 발현율은 기존의 형질전환동물에서 볼 수 있는 우유 중의 단백질 발현율에 비해 현저하게 높은 것이다.

125> 따라서, 본 발명의 프로모터를 이용하여 제조한 형질전환동물은 우수한 효율로 소변 중에 목적 단백질을 생산하게 할 수 있다.

126> 2) 본 발명의 형질전환 생쥐로부터 얻은 EPO의 생리활성 확인

127> 본 발명의 형질전환 생쥐로부터 얻은 EPO의 생리활성을 확인하기 위해, 실시예 3의 1)에서 얻은 EPO를 EPO 의존성인 간세포에 첨가하고 배양하였다. 이때, 비교군에는 시판 중인 EPO를 첨가하였다. 배양한 지 24, 48, 72 시간별로 세포의 생존율을 측정하여, 그 결과를 표 1에 나타내었다.

128> 【표 1】

배양시간	DMEM/F12(%)	FBS	FBS+시판 EPO	FBS+본 발명의 EPO
24	38.5 ±6.8	54.9 ±4.3	58.2 ±6.6	72.1 ±4.7
48	21.6 ±7.4	39.9 ±2.9	50.0 ±2.4	60.4 ±7.5
72	10.0 ±4.6	20.8 ±1.7	39.6 ±3.8	53.9 ±4.0

129> 표 1에 나타난 바와 같이, 본 발명의 형질전환 생쥐의 소변에서 분리한 EPO는 모든 시간대에 있어서, 시판 중인 EPO보다 더 높은 생리활성을 나타내는 것으로 관찰되었다.

130> 따라서, 본 발명의 프로모터를 이용하여 제조한 형질전환동물을 통해, 기존의 방법으로 얻을 수 있는 단백질보다 훨씬 우수한 생리활성을 나타내는 단백질을 얻을 수 있다.

【발명의 효과】

131> 본 발명의 프로모터는 방광 특이적인 목적단백질 발현을 유도하며, 기존의 방법에 비해 매우 높은 농도로 소변 중에 목적단백질을 발현한다.

132> 본 발명의 프로모터 및 그 조절을 받는 목적단백질로 이루어진 발현 벡터로 형질전환된 동물은 기존의 형질전환동물에 비해 훨씬 높은 효율로 소변 중에 목적단백질을 분비한다. 또한 본 발명의 형질전환동물로부터 얻은 단백질은 기존의 동종 단백질이 나타내는 것 이상의 우수한 생리활성을 나타낸다.

133> 따라서 본 발명의 프로모터, 이를 이용한 발현 벡터 및 형질전환동물은 의약학적으로 중요한 가치를 지닌 유용단백질의 생산 분야에 유용하게 사용될 수 있다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

돼지의 유로플라킨 II 유전자의 프로모터

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 서열번호 1의 염기서열, 또는 상기 서열에 하나 이상의 붕괴, 결실, 삽입, 점, 치환, 논센스, 미스센스, 다형현상, 재배열 돌연변이가 일어난 기능적 등가물 중 선택된 하나임을 특징으로 하는 유로플라킨 II 프로모터

【청구항 3】

제 2항에 있어서, 서열번호 1의 염기서열임을 특징으로 하는 유로플라킨 II 프로모터

【청구항 4】

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항의 프로모터 염기서열 및 그 3' 쪽으로 목적단백질을 암호화하는 염기서열을 포함함을 특징으로 하는 발현 벡터

【청구항 5】

제 4항에 있어서, 목적단백질은 인간 EPO(erythropoietin)임을 특징으로 하는 발현 벡터

【청구항 6】

제 5항에 있어서, 기탁번호 KCTC 10352BP로 기탁된 발현 벡터 pUP2/hEPO

【청구항 7】

제 4항 내지 제 6항 중 어느 한 항의 발현 벡터를 도입시킨 동물 수정란

【청구항 8】

제 7항의 수정란을 이식시켜 얻음을 특징으로 하는 형질전환동물

【청구항 9】

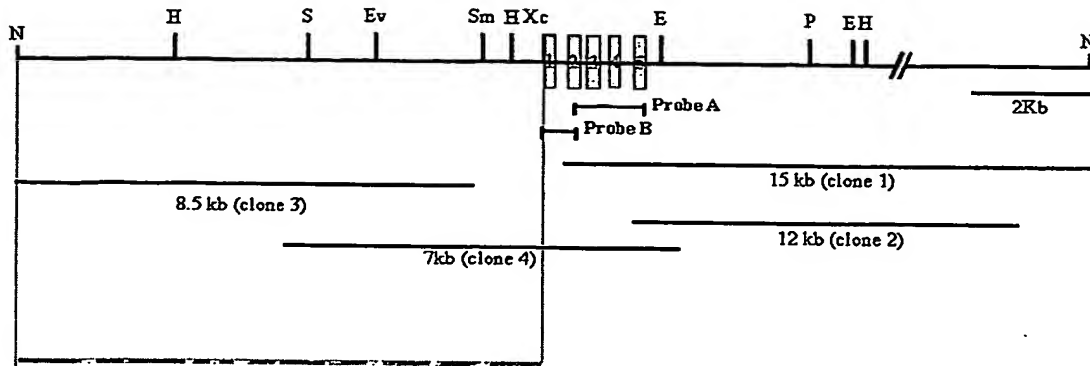
제 8항에 있어서, 돼지, 생쥐, 소, 닭, 양 또는 염소 중 선택된 하나임을 특징으로 하는
형질전환동물

【청구항 10】

제 4항 내지 제 6항 중 어느 한 항의 발현 백터를 도입시킨 동물 수정란을 대리모 동물
에 이식하고, 상기 대리모 동물로부터 형질전환동물을 얻고, 상기 형질전환동물의 소변으로부
터 유용단백질을 분리·정제하는 단계로 이루어짐을 특징으로 하는 유용단백질의 제조 방법

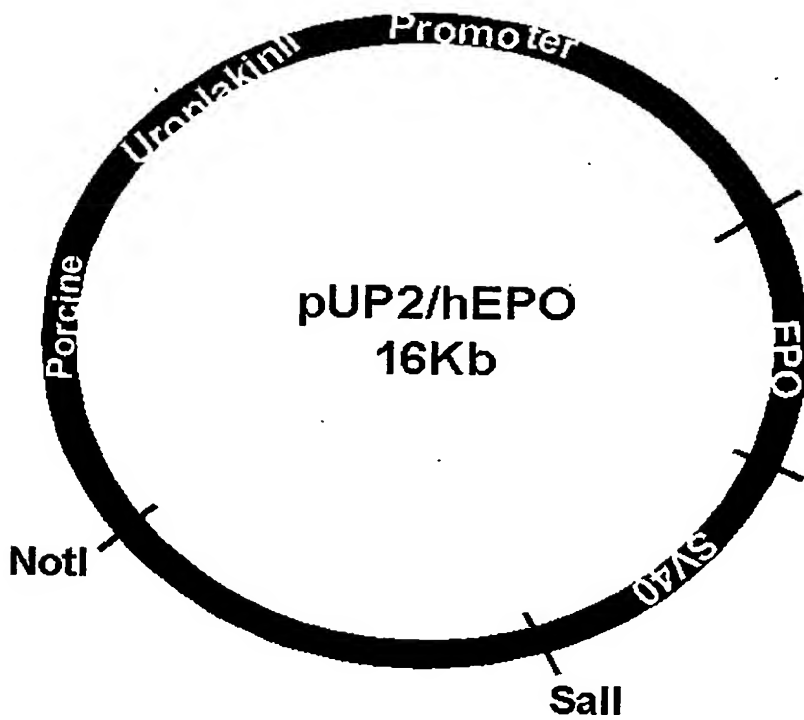
【도면】

【도 1】



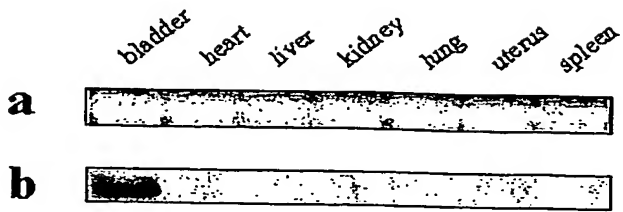
Porcine UP2 promoter : 8847kb

【도 2】



pUP2/hEPO Expression Vector

【도 3】



【도 4】

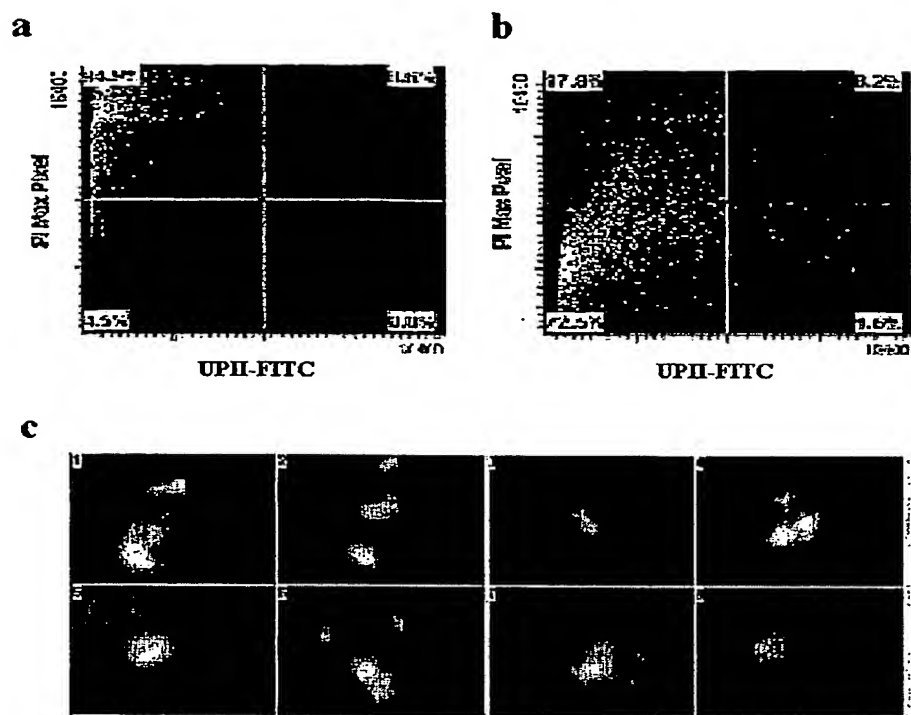
a



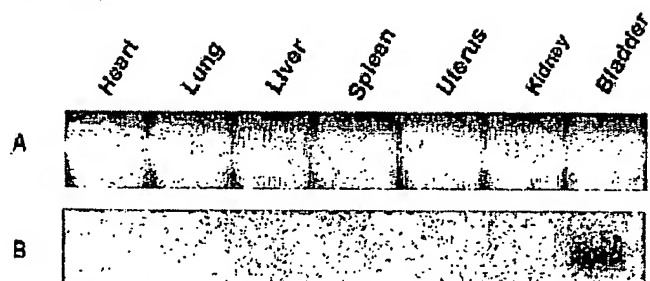
b



【도 5】

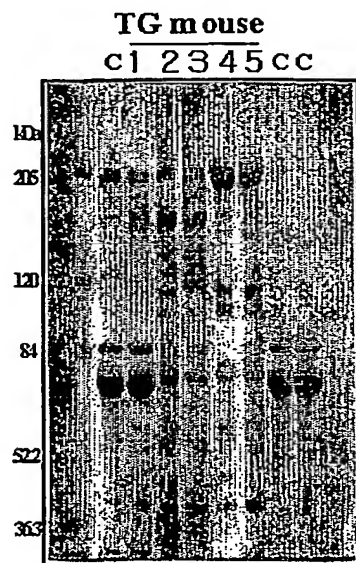


【도 6】

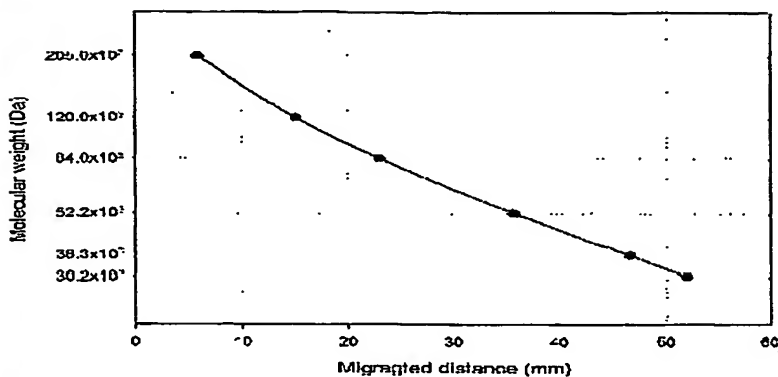


【도 7】

a

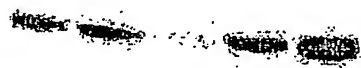


Separation of protein by SDS-PAGE (7.5%)



b

C 1 2 3 4 5 C



【서열목록】

<110> CHO-A PHARM CO., LTD. KIM, Jin Hoi <120> Porcine uroplakin II
 promoter and the production method of useful proteins using said promoter <
 130> 02P-314 <160> 4 <170> KopatentIn 1.71 <210> 1 <211> 8847 <212>
 DNA <213> Sus scrofa <220> <221> promoter <222> (1)..(8847) <223>
 porcine uroplakin II promoter <400> 1 gggctaggag tggaatcaga gctggcctat gccacagcaa
 cgcagaatcc aaaccacatc 60 tccgacctac accagaccgt caccataaca caggatcctt
 aaccactga gcaaggtcag 120 ggatcaaacc caaatcctca tggatactag tcgggttctt

aacccgctga gccacagtgg	180 gcactcctgt ttttgtttgt gtcttcgttt tttggctgca
tctgcagcat acagaagttc	240 ctgggttaag gattgaacct atgccacagc agcaacctga
gccacagcag tgacaacagc	300 ctgataccta actgctagac caccagggaa cgccccctca
acttttcatg ccttggaaac	360 cctgagtcag tacaacctga caatngnttt ttttttttt
tttttttgcc ttttctaggg	420 ccacttcccg cggcatgttg agattcgcag gctanaggtc
taatcggagc tgtagccacc	480 ggcctacacc agagccatag caacgaggga tccgagccga
gtctgcaacc tacactacag	540 ctcatggcaa caccggatcg ttaaccact gagcaaggcc
aggggatcga acccgcaacc	600 tcatggttcc tagtcagatt cgtaaccac tgcaccatga
caggaaactcc caacctgaca	660 attttatcat ttctgcaccc tagttgttga gtaatttgaa
aaattcccaa gatgtcaagg	720 tcagtgtgat ggtaatttt atgtgtcaac ctgactaggc
catgttgccc ggatgtggag	780 tcattgttat tctggatgtt actgtgaaga tatgttttgg
atgaaattaa catttaaadc	840 agtgggggga aaaaaagaag ttctcgttct ggtgcatcag
aaacaaatcc gactaggaaa	900 caagcggttg caggttcgat ccctggcctc acttagtgga
gtcaggatct ggcgttgccg	960 tgagctgttg tacagggtggc agatgcagct cggatctagc
attgctgttg ctgtggtgta	1020 ggccagcagc ttagctctg attaaacccc aagtctggga
acctccatat gccgtgggtg	1080 tggccccgaaa aagcaaaaaa taaataaata aataaattta
aaccagggga ttttgagcaa	1140 agcagattac ccataatat ggggtgggtct catcaagttc
attgtaggcc ctagtggaac	1200 aaagaccgac ctccaccttc tccccatgag aaggaaagaa
ttctgcaaaa agaccgcctt	1260 nggacntaaa ctgcaactct ttcttgagtt tccagcatgt
tggcctcccc catcagactt	1320 tggacttgcc aagcctccgc aattgcatga gccaatcct
taaaataaat ccgtctatat	1380 atacacatcc tgttggttct gtttctccag agaaccctga

ctaacgcagt ctgcaccct	1440 gaagaccagt ggtccccaca ctcagctggg tgtcacctcc
aaacactcag ccttcctcaa	1500 ggctctttct agctgtgtcc tcctctcccc acaacagctg
tttcaaactc tcaccctct	1560 tcagggcgca atcccttctc ctccctgagt ttcctacttc
ccagagaaag cagagacctt	1620 caggagtgtg ctgccttaac ttacttcctt catccctcag
ccttgcaaaa gtataagctt	1680 tctctgcacc actgccccat tcttctctct gcagacaggg
tcattcctaa agccaaacgc	1740 taatgcctcc acctctgac tgagtcccat cttttccctc
ctccagaagc ttcctcataa	1800 attctacccc cttttcttcc ttatctttat ctttgaaaac
aaaatggaag acagccttcc	1860 cgttgtggtg cagcggaac agtggtgcct tgggaagcgt
gggacgcagg ttcgaccct	1920 ggcccagcat agtaggttaa ggatccagtg ttgccacagt
tttggttag attgaaactg	1980 cagctcagat ctggtccttg gcctgggaac ttcatacgcc
acaggacggc ccaaaaagaa	2040 aagaaagaaa aaataaaaaa caaacagaa aagcctttcc
tgtaccccca attcctcca	2100 gttatctctc tctttccctt cccagccaag ctctgcaaag
agcggctgc acagttctaa	2160 ctctacctcc tcccagttgg ccctggactt tctcagtctg
gcttctacce cctcaccg	2220 taggaatctg ctctgaagga cagcacccc tcacgatcct
tggcccaggg acattttttg	2280 taccagcctt tcaatcctga cttcatatc atccgacacc
tcctttgtga aaccctccat	2340 ccactttctc ctggttcccc tcctaagacc cattccgcct
tcttcagccc cctccctcca	2400 tctgtccttt agatgccgca tttcctagta tcctgtcctg
cgcggnctcg tccttcctt	2460 ccacaactct ctcaaggac tcttttctcc atgtgcgatt
ttgcccattgg cccaccttcc	2520 ctctctttac ccagacttc ccccggtgct ccagactcat
agactcaatt atgaaaacat	2580 agttttcatc tgatttgccc aagatatttg cattagttat
tactgtataa cagcttatcc	2640 cccaatttag tggcttataa aataaacact tattctgaga

atcagaaacc taggcaggac	2700 atagttgggg tctcatgaag ttgcactgaa aatgtccccc
tgggctaatac atacggagga	2760 ctgaccaggg ctggaggatc tgttccaagc tcattcattc
acatggccgt aggttggaga	2820 cagctcttct ctggatcttg gcaggagcct caattccttg
tcacgtggac ctccccttgg	2880 aggggggtccc atgtcctcca tggtagtaa tccatgagag
caaggtggaa ggtgccatgc	2940 catttaggac ctagcctcag gagggaccta cgtcacttct
gttgtagtct gttggccaca	3000 cagactaacc ctgacacaat gcacccatcc atgacctgct
gccagtccat tctccacact	3060 gtttccagaa tgatatctac ataagtaaaa ctctcacaag
gcttttgaga ttttttttcc	3120 cattatagtt gatttataac ctgagaggct tttgttttct
tcagcataaa aaccaagttc	3180 cttaacatag catgtaacct actggccacc ctgccagtgg
ctagaactct caccatgtcc	3240 atccttgaat actgctttct agccaagagc tattgtttgc
agttcccaga atgtgtcggg	3300 ataactcaca tctctgagcc tttcatgtg ctgttccctc
actttggaat atccccttcc	3360 atttaggaag gctaattgtc attcatntc caaaactcag
aagcaaattt tttttttttt	3420 tttttttttt tttttttgct ttttagggcc gaactctcag
catatggagg ttcccaggtt	3480 agccatcaaa ttggaattgt agctgctggc ctacaccaca
gccatagcaa caccagacct	3540 aagtcacatc tgcaacctac atcacagatc atggcaatac
tggatcctta acccactgag	3600 tgagcccagg gatcaaacac aaattctcat ggatactcgc
caggttcatt accactgagc	3660 cacaacagga actcctctcc tttttatggt cacacctgca
gcatatggaa gttcctgggc	3720 cagggattga atctgagtgg cagctgtgac aatgccgtat
ctttaattc actgtgctgg	3780 gctgaggggn taaantgccc ctcttaaaaa acctgagctg
ctgcagttgg attcttaatc	3840 cactgcacca caagggggaa ggtcaagaac tgtcttgcca
tctctgtatc ttatcaccta	3900 gcatagtacc caccatagag aagttgctca acaaagtgtt

actgaatgaa taaatgcatg	3960 agctggagtt cccattgcgg ctacagcagta acaaacctga
ctagcattca taagaacttg	4020 ggttcgatcc ctacccctcag tgggttaagg atgcagcatt
gctgtgagct gtggtgtagg	4080 tcgcagacga cactcagatc ccacattgct gtcactgtgg
cgcaggccgg cctctgtagc	4140 tctgattcga ctccctagcct gggaacgtcc atatgccaca
ggtgaggccc taaaaagaaa	4200 taaataagca agcaagtaag caagcaggca gtttcttgg
gccttgtagc cctgtggcct	4260 gtgtggtata caagtaacag ctgatccatg tctcagtcac
gtttccccct cagactacct	4320 ttccctgccc atctctccct ttgacataat tggaaaaaca
aattcagaat tttgtccac	4380 tacctttctt gctagctctg tggccttggg aaagctattt
attgcctctg agcctcta	4440 tttcatctgc accaaggatt aataaaaagg agaggataag
atgaattact tatattaata	4500 tttattgaac cagatactgt gctaggcact cttaaataaa
ttagcttgag tgatagtcac	4560 agtatcctgg tgagacagat ttttttttc cttttatggt
tgacagtga acatatggaa	4620 gtccctgggc tggggtcgaa ttggagctgc aggtgcttgc
ctatgccaca gccatggcaa	4680 catcatatac aaaccgcacc tgtgacctac accacagatt
gcagcaacgc tggatccttc	4740 acccaaggag caaggccagg aatcaaatgt gcacccctac
aaacactatg tccggttttt	4800 aaccgctga gccacaccag gaactccatg gcgagacaga
ttttatactc tgtctacaga	4860 agaggaaagt gaagctcaga atggtttaggt aggttaactg
gccaaagatca aaaaattcaa	4920 agaagatttg gggcaagtgg tgatatcatg gcagcattag
aaaaaataaa gaagcatcca	4980 cttgttttcc aacactgaac aactgagatt ttcttactct
cacagctttt tccagcttca	5040 tatccaagga cagacgtctt gccattttcc catcagacca
atatttgctg aacactgcac	5100 ctttactttt aggtccaagt caccaggggt tttcccagtt
tgctcctaca gattctgaca	5160 ctatctccac attttttttg cacctttatt ttaaagcatt

tttatacctg tcataccttg	5220 ctagataaat gggaaggaat gaatcttccc atttataggt
gagaaaattg aggttcaaag	5280 tgactcacca aaagtcatat agcatcactc ctcaacagga
ggacagcagt ccccaccaga	5340 gggtaacatg tccatggagc ctagtggaca catttttcta
actgactggg aagcagcaga	5400 gtggtattgt gaagggggaa tcataggtat atcaaacaga
cttaggttct gatccgagct	5460 attctgcttg caaacaacca tagttcaatt taaaaaaaaa
aaagaaagaa agaaagaaag	5520 aaaggagccc ccatcctggt gcagtggaaa caaatccaac
taggaactgt gaggttgttg	5580 gticgatccc tggccttgct cagtgggtta aggatctggc
gttgccatga gccgtggtgt	5640 aggttcaga ctcaactcag atctggcggt gctgtgactg
tggctgtgat gtaggctggc	5700 agctgtaact ccggttagac ccagcctgg gaacctccat
atgcaacctc catatgcggt	5760 ggggtgtggc ctaaaaagaa aaaaaaaaaa aaaagaggaa
ttcccttatg gctcagcagg	5820 ttaaggatct ggtattgtca ctgctgtggc tctagttaca
gccatagtgc aggttcaatc	5880 cctggcccag gaacgtctgc atcccacagg tgtggccaaa
aaagaaagaa aggaaggagt	5940 tctgttgttg cacaatagga ttggcaacat cttaggagta
ctgggacaca ggttcaatcc	6000 ctggcccagc acagtgggta aggagccagt gttgctggtc
aaaaaagaaa agaaaaagta	6060 ccatagttag agtaaatctg ttttaggagc tattctttgg
ggcagaacag agagatcagg	6120 agctccttga gagcagaaac ttacctttac atccctcgtg
cctagcacgg ttctaggggc	6180 atacctggta ttttaataaat atagccaact ggatagggga
ttggaaggaa agagcagggg	6240 aggggaacttg agtgagttga aaaattgaga atccaaaggg
gagacagcct agaaagagta	6300 ggtccaagaa agagatcca ggcatttgtg gccctggttc
cctttttcca agccatgagg	6360 aaatcctcag aggaacagag tgctgtggct ttaaattgact
tcagcgttgt caatgaatct	6420 gctcggctaa aagagttatc ctcttgctcc ttgccttgct

ctccccctcc tctcagctcc	6480 ccaaaccctt ctggctgct gtgatgggat aattagatgc
gagagctcag cacagatgat	6540 gctccagttg cctagcaact aatggtttcc atggagaccg
caaagcacag cctccagagc	6600 agccagtgag cagctcggca gggcagggag aagacgcaac
tctcagctcc tccagaaacc	6660 tggggagggc caggagtggg gaagaagggg gggatcggag
ggcttaaagg cacaggcccc	6720 tcttatcctc ttaaaatctg gtcagagctc tgcctcccc
tcccctactc tgtcccactc	6780 ataatttcag atggagttagg gggcttagga gtggacccaa
cacaacctac cctgcaataa	6840 acccaacctt ctttctgctt ctggtttgtg gctgaaaatg
gnaaaagaaa tctcccaagt	6900 gcaagtgtaa acancntcct gggttggcaa tgggatctga
agagtactaa gatccctcag	6960 acctggaatt ccaccattta gtctttccct ctctccaaag
ttctcaatgt gcaaaagatc	7020 ctctttcagt ttgcagagca atgataggat ctctctaaaag
gagacaaaag ccaaggtgca	7080 ggaaaaatag aattcagttc ttcacccaaa ggcagcctgt
cctgggagac aggggtgaaa	7140 cacttgggtc tgatctccat cagaggatcc agagtgtgtg
tgtttgttgc tggggagggg	7200 gacacaatat agagcatctg gtgactcaaa gtatgtgcct
cccagagtag catcaatcaa	7260 tgttacctgg aagcttgta gaaatgcaga atttcaggct
tcacctcaga cccactgaat	7320 cagaaactgc atcttaacaa gatccctcat gattcatacg
cacattaaat ttggagaagc	7380 gctgacctga gaccctctc ctctctgctt gggcccatag
ttctaccttt attgtcacct	7440 cgtctcacct cgtgctcata cccaggctt tgagcctacc
ctcccccca tggggaaagg	7500 acacaaggcc accagcccct cacttccta ccaggaccct
ggccctctc tgggactgga	7560 gaaggacaaa gaggacccc tctgtggagg tctacgacct
ctcctgacca agtagtcac	7620 tcaccacaag tggctctacc tctctgagtc tcagtttcca
catccacaaa aggtggccaa	7680 tgctatctgc caccagaat ggctgtgagg gtggagcagg

caaagcctct gtgccatcag	7740 agaaattgtg tctctttttc attttctccc agtgggtttc
tttctcgtct ttattctttt	7800 tttttttttt ttttctgtc tgttgatatt ttagggccgt
gcctgtggca tacggaagtt	7860 cccagggtag gggccaatg ggagctgtag cccggggcct
acgccacagc cacagcaatg	7920 tgggatctga gccacgtctg caacctacac cacagctcac
ggcaacacca gacctaatac	7980 ccactgagca aggccaggga tcgagcccac gtcctcatgg
atgctagtgt ggttcgttaa	8040 ccgctgagcc atgatgataa ctctctttc tattctttag
tcacaaacag tcaacaagg	8100 ttgctgacca aggtgatcg tgcccacccc ccagcccccc
agactgggcc agtgcccacc	8160 ccttgggtct ctctggaaat cctgcccage atcaattggc
tccactctcc aggaggatgg	8220 gaagccctgt ggcccctggg actcacaccc ctctgcatct
cccagagtgc aggacctggt	8280 cttcaggaga caccaagaac tggctccccc ggctctgctg
ccccacccc ctactaccag	8340 tttctctccc attcctgccc agtccaggcc ccctgggggtt
actctcctct ctctgtacac	8400 cagtgaacc tcagaacctg cttccctcct gggaacaccc
actaccacgt gggagaaggg	8460 gtcgtctagg ggttgggccc cagatacact tgtaagcagg
aacacacgag cccttacatg	8520 tgggtgtccc ggaagaaggg ggttttcac cccccgttt
agtcaccctg cccctctgca	8580 gctgcctgag ccaccaagac ccagccaagg tctcctgcct
tctggcctga gggccagctc	8640 cccatcctga aaaacctgtc tgggggcctc ccctgaggct
gtagggccca aggcctcccc	8700 tgaggctgta gggcccaagg ggcaggttga acaggattcc
cctctggccc ctctacccc	8760 caggacaaaa ccagagcccc aggacagggc ctacttgcc
tcaggaaacc acagcttgcc	8820 agcaccacgc ccagcaccag ccagct

8847 <210> 2 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

forward primer for amplifying porcin uroplakin II gene <400> 2 gatcctgatt

ctgctggctb

20 <210> 3 <211>

20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> reverse primer for
 amplifying porcin uroplakin II gene <400> 3 atggtggtca tcacrgtgct

20 <210> 4 <211> 3602 <212> DNA <213> Homo sapiens <300> <301> Lin,
 F. K. Suggs, S. Lin, C. H. Browne, J. K. Smalling
 R. Egrie, J. C. Chen, K. K. Fox, G. M. Martin, F.

Stabinsky, Z. <302> Cloning and expression of the human erythropoietin gene <303>

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. <304> 82 <305> 22 <306> 7580-7584 <313>

1-3602 <400> 4 aagcttctgg gcttccagac ccagctactt tgcggaactc agcaaccag gcattcttga

60 gtctccgccc aagaccggga tgccccccag gggaggtgtc cgggagccca gcctttccca 120

gatagcacgc tccgccagtc ccaagggtgc gcaaccggct gcactccct cccgcgaccc 180

agggcccgagg agcagcccc atgaccaca cgcacgtctg cagcagcccc gctcacgccc 240

cggcgagcct caaccaggc gtcctgcccc tgctctgacc ccgggtggcc cctaccctg 300

gcgacccctc acgcacacag cctctcccc accccaccc gcgcacgcac acatgcagat 360

aacagccccg acccccggcc agagccgcag agtccttggg ccaccgccgc cgctcgctgc 420

gctgcgcccgc accgcgtgt cctcccgagg ccggaccggg gccaccgcgc ccgctctgct 480

ccgacaccgc gccccttga cagccgccct ctctcttagg cccgtggggc tggccctgca 540

ccgccgagct tcccgggatg agggccccgc gtgtggtcac ccggcgcgcc ccaggtcgct 600

gagggacccc ggccaggcgc ggagatgggg gtgcacggtg agtactcgcg ggctgggcgc 660

tcccgccgcc cgggtccctg tttgagcggg gatcttagcgc cccggctatt ggccaggagg 720

tggctgggtt caaggaccgg cgacttgtca aggacccccg aagggggagg ggggtggggc 780

agcctccacg tgccagcggg gacttggggg agtccttggg gatggcaaaa acctgacctg	840
tgaaggggac acagtttggg ggttgagggg aagaaggttt gggggttctg ctgtgccagt	900
ggagaggaag ctgataagct gataacctgg gcgctggagc caccattat ctgccagagg	960
ggaagccict gtcacaccag gattgaagtt tggccggaga agtggatgct ggtagctggg	1020
ggtgggggtg gcacacggca gcaggattga atgaaggcca gggaggcagc acctgagtgc	1080
ttgcatgggt ggggacagga aggacgagct ggggcagaga cgtggggatg aaggaagctg	1140
tccttcaca gccacccttc tccctccccg cctgactctc agcctggcta tctgttctag	1200
aatgtcctgc ctggctgtgg ctctcctgt cctgtctgc gtcctctctg ggcctcccag	1260
tcctgggcgc cccaccacgc ctcatctgtg acagccgagt cctggagagg tacctcttgg	1320
aggccaagga ggccgagaat atcacggtga gacccttcc ccagcacatt ccacagaact	1380
cacgctcagg gcttcaggga actcctccca gatccaggaa cctggcactt ggtttgggg	1440
ggagtgggga agctagacac tgcccccta cataagaata agtctggtgg ccccaaacca	1500
tacctggaaa ctaggcaagg agcaaagcca gcagatccta cggcctgtgg gccagggcc	1560
gagccttcag ggacccttga ctccccgggc tgtgtgcatt tcagacgggc tgtgctgaac	1620
actgcagctt gaatgagaat atcactgtcc cagacaccaa agttaatttc tatgcctgga	1680
agaggatgga ggtgagttcc ttttttttt tttttcctt cttttggaga atctcattg	1740
cgagcctgat tttggatgaa agggagaaatg atcgggggaa aggtaaaatg gagcagcaga	1800
gatgaggctg cctgggcgca gaggctcacg tctataatcc caggctgaga tggccgagat	1860
gggagaattg cttagaccct ggagtttcag accaacctag gcagcatagt gagatcccc	1920
atctctacaa acatttaaaa aaattagtca ggtgaagtgg tgcatggtgg tagtcccaga	1980
tatttgaag gctgaggcgg gaggatcgct tgagcccagg aatttgaggc tgcagtgagc	2040

tgtgatcaca cactgcact ccagcctcag tgacagagtg aggcctgtc tcaaaaaaga	2100
aaagaaaaaa gaaaaataat gagggctgta tggaatacat tcattattca ttcactcact	2160
cactcactca ttcattcatt cattcattca acaagtctta ttgcatacct tctgtttgct	2220
cagcttggtg ctggggctg ctgaggggca ggaggagag ggtgacatgg gtcagctgac	2280
tcccagagtc cactccctgt aggtcgggca gcaggccgta gaagtctggc agggcctggc	2340
cctgctgtcg gaagctgtcc tgcggggcca ggccctgttg gtcaactctt cccagccgtg	2400
ggagcccctg cagctgcatg tggataaagc cgtcagtggc cttcgcagcc tcaccactct	2460
gcttcgggct ctgggagccc aggtgagtag gagcggacac ttctgcttgc cttttctgta	2520
agaaggggag aagggtcttg ctaaggagta caggaactgt ccgtattcct tccctttctg	2580
tggcactgca gcgacctcct gttttctcct tggcagaagg aagccatctc ccctccagat	2640
gcggcctcag ctgctccact ccgaacaatc actgctgaca ctttcgcaa actcttccga	2700
gtctactcca atttcctccg gggaaagctg aagctgtaca caggggaggc ctgcaggaca	2760
ggggacagat gaccaggtgt gtccacctgg gcataccac cacctccctc accaacattg	2820
cttgtgccac accctcccc gccactcctg aacccctcg aggggctctc agctcagcg	2880
cagcctgtcc catggacact ccagtgccag caatgacatc tcaggggcca gaggaactgt	2940
ccagagagca actctgagat ctaaggatgt cacagggcca acttgagggc ccagagcagg	3000
aagcattcag agagcagctt taaactcagg gacagagcca tgctgggaag acgcctgagc	3060
tcactcggca ccctgcaaaa ttgatgcca ggacacgctt tggaggcgat ttacctgttt	3120
tcgcacctac catcagggac aggatgacct ggagaactta ggtggcaagc tgtgacttct	3180
ccaggtctca cgggcatggg cactcccttg gtggcaagag ccccttgac accggggtgg	3240
tgggaaccat gaagacagga tgggggctgg cctctggctc tcatggggtc caagttttgt	3300

gtattcttca acctcattga caagaactga aaccaccaat atgactcttg gcttttctgt 3360
tttctgggaa cctccaaatc cctgggtct gtcccactcc tggcagcagt gcagcaggtc 3420
caggtccggg aaatgagggg tggagggggc tgggccctac gtgctgtctc acacagcctg 3480
tctgacctct cgacctaccg gcctaggcca caagctctgc ctacgtggt caataagggtg 3540
tctccattca aggcctcacc gcagtaaggc agctgccaac cctgcccagg gcaaggctgc 3600 ag

3602